

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08313

研究課題名(和文) CRISPRスクリーニングによるT/NK細胞性リンパ腫の網羅的分子標的同定

研究課題名(英文) CRISPR screening for identification of molecular targets of T/NK cell lymphomas

研究代表者

中川 雅夫 (Nakagawa, Masao)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：80435859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：新規ゲノム編集技術CRISPR/Cas9を用い、全ゲノムスケールの19,114遺伝子を評価対象とした機能的遺伝子スクリーニングをT/NK細胞性リンパ腫細胞株に対して施行し、各T/NK細胞リンパ腫病型の細胞増殖・生存に必須の遺伝子群を同定した。この中の数遺伝子に関して検証実験を行い、いずれもノックアウトによりT/NK細胞リンパ腫細胞株の増殖・生存がそこなわれることを確認できた。これにより当研究の目的であるT/NK細胞リンパ腫の治療標的分子・分子シグナリングの包括的リストの作成を達成できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

T/NK細胞リンパ腫の多くは現行の治療に対して5年生存率30%と予後不良である。今回の研究からT/NK細胞リンパ腫の治療標的分子・分子シグナリングの包括的リストを作成できたことで、新規分子標的治療開発が加速され、将来的にT/NK細胞リンパ腫の治療成績の向上に貢献することができる。また、T/NK細胞リンパ腫の増殖・生存の分子メカニズムの理解が進んだ点は学術的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed genome-wide CRISPR-Cas9 screens in multiple T/NK lymphoma cell lines for identifying essential genes for cellular proliferation/survival in a series of T/NK cell lymphoma cell lines. Positive and negative control sgRNAs were correctly identified through the entire screening, confirming the validity of the screening results. We identified genes which were selectively essential for each disease group in T/NK cell lymphomas. Some among the essential genes were confirmed in the follow-up functional experiments. All together, we established an entire list of candidate genes for molecular targeted therapies in T/NK cell lymphomas.

研究分野：血液腫瘍学、分子腫瘍学、分子生物学、腫瘍免疫学

キーワード：T細胞リンパ腫 NK細胞リンパ腫 ATLL CRISPR 分子標的治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンシング技術の発達から、近年 T/NK 細胞性リンパ腫においても膨大ながんの遺伝子 DNA 変異/発現異常のデータが集積・発表されている。次の重要な課題は、治療標的やバイオマーカーとしてどの遺伝子が機能的に重要なのかを明らかにすることである。研究代表者は、これまで T 細胞性リンパ腫を中心に、アレイ CGH 法によるゲノム増幅欠損領域の決定、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子変異解析(RNAseq)から CCR4 ケモカインレセプターにおける機能亢進型点突然変異の発見 (T 細胞性リンパ腫の 1 病型である成人 T 細胞性白血病リンパ腫(ATLL)の 26%)など、悪性リンパ腫の分子病態の解明に貢献してきた。さらに治療標的・バイオマーカーとなる「機能的」遺伝子を解明するため、2011 年より shRNA を用いた網羅的な機能的遺伝子スクリーニング法を T 細胞性リンパ腫細胞株に対して導入、その研究成果として幾つかの治療標的遺伝子候補を同定した。しかしながら shRNA を用いた網羅的な機能的遺伝子スクリーニング法では、その効率・特異性に限界があり、スクリーニング対象遺伝子数は約 1000 個が限界であった。より多くの遺伝子をスクリーニング対象にできる新技術を導入し、T/NK 細胞性リンパ腫の新規治療標的分子やバイオマーカーを見出し、臨床応用への橋渡し研究へ道筋をつける必要がある。

2. 研究の目的

革新的ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を用いた網羅的機能的遺伝子スクリーニングを T/NK 細胞性リンパ腫細胞株に対して施行し、全ゲノムスケールの 19,114 遺伝子の中から治療標的分子候補を同定し、臨床への橋渡し研究への基盤を作る。

3. 研究の方法

(1) スクリーニング可能な細胞株の作成

ヒト T/NK 細胞リンパ腫病型から樹立された細胞株に対して Cas9ヌクレアーゼを導入し、T/NK 細胞リンパ腫細胞株において標的遺伝子を極めて高確率にノックアウトできるシステムを確立するため、細胞株に Cas9ヌクレアーゼを発現導入する。

(2) 全ゲノムスケールでの機能的遺伝子スクリーニング(CRISPR スクリーニング)の実行

スクリーニング方法は Nat Methods. (2014) 11, 783-784. に基づきつつ、さらに研究代表者の過去の shRNA ライブラリースクリーニングから得たノウハウを加え、プロトコルの最適化を行った。プラスミドレポジトリーである Addgene から、19,114 遺伝子に対して 76,441sgRNA が含まれたレンチウイルスライブラリーを入手した。293T 細胞にトランスフェクションし、sgRNA ライブラリーレンチウイルスを作成し、(1) で作成した Cas9 導入 T/NK 細胞性リンパ腫細胞株に感染させた。Puromycin で sgRNA が導入された細胞を純化後、半分の細胞からゲノム DNA を抽出し(Day0 DNA)、残りの半分は継代培養後の 28 日目にゲノム DNA を抽出した(Day28 DNA)。抽出したゲノム DNA から、レンチウイルスゲノム配列に特異的な PCR プライマーを用いて sgRNA 配列を PCR 増幅し、精製後にイリミナ次世代シーケンサーで解析した。Day0 に比較して Day28 でそのリード数が減少していた sgRNA を同定した。この sgRNA の標的遺伝子は T/NK 細胞性リンパ腫細胞株の細胞増殖能あるいは生存能に必須の遺伝子であることから、T/NK 細胞性リンパ腫細胞に対する治療標的候補遺伝子と考えることができる。

(3) CRISPR スクリーニング結果の確認：

得られた大規模スクリーニングデータセットを解析し、各 T/NK 細胞リンパ腫病型に特徴的な治療標的遺伝子候補を同定する。

4. 研究成果

(1) スクリーニング可能な細胞株の作成

様々な T/NK 細胞リンパ腫病型から樹立された細胞株に対して Cas9ヌクレアーゼを導入し、最終的に 4 病型 10 種類の細胞樹立に成功した。これらの細胞で標的遺伝子を極めて高確率にノックアウトできることを確認できた。これにより 19,114 遺伝子を標的とする CRISPR スクリーニングを施行する本研究の基盤が整った。

(2) CRISPR スクリーニングの実行： Cas9ヌクレアーゼを導入した T/NK 細胞リンパ腫細胞株

に対し、19,114 遺伝子に対して 76,441sgRNA が含まれたレンチウイルス sgRNA ライブラリーを感染させ、28 日間の継代培養を経た細胞からゲノム DNA を抽出した。感染直後の細胞からのゲノム DNA と共に、レンチウイルスゲノム配列に特異的な PCR プライマーを用いて sgRNA 配列を PCR 増幅したものを、次世代シーケンサー-NEXTseq500 でシーケンスした。感染直後と比較して 28 日間の継代培養の間に細胞数を有意に減少させた sgRNA を網羅的に同定した。最終的に T/NK 細胞リンパ腫細胞株 9 種類において CRISPR スクリーニングのデータセットを作成することができた。スクリーニング中にはネガティブコントロール sgRNA を 1000 個(どの遺伝子もノックアウトすることのない sgRNA)が含まれており、これらは感染直後と比較して 28 日間の継代培養の後にもその数に大きな変化は見られなかった。一方、ポジティブコントロール sgRNA(当

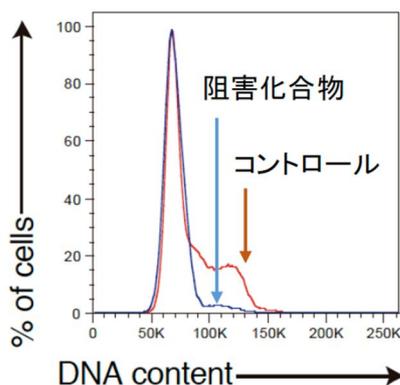
該遺伝子をノックアウトするとほぼ全ての細胞種で細胞毒性を示すことが既報でわかっているもの)は、感染直後と比較して 28 日間の継代培養の後にその数に大きな減少を認めていたことから、本スクリーニングは正しく機能しており、ここから得られるデータは解析に値するものであることを確認することができた。これにより各 T/NK 細胞リンパ腫の細胞増殖・生存に必須の遺伝子群を同定した。

(3) CRISPR スクリーニング結果の確認： (2)で得られた大規模スクリーニングデータセットを解析し、各 T/NK 細胞リンパ腫病型に特徴的な治療標的遺伝子候補を同定した。この中の数遺伝子に関して検証実験を行い、どの遺伝子もノックアウトにより T/NK 細胞リンパ腫細胞株の増殖・生存が損なわれることを確認できた。これにより当研究の目的である T/NK 細胞リンパ腫の治療標的分子・分子シグナリングの包括的リストの作成を達成できた。このリストには他疾患(固形腫瘍)に対する治療薬として保険適応となっている薬剤の標的分子が含まれており、この薬剤は T/NK 細胞リンパ腫に対する新規治療薬として有望であると考えた。そこで T/NK 細胞リンパ腫細胞株に対して当該薬剤処理を行ったところ、顕著な細胞周期停止(図1)およびアポトーシスの増加(図2)を誘導できることを確認することができた。これにより、本研究で見出された包括的リストの有用性を具体的に示すことができた。

(図1)

T/NK細胞リンパ腫細胞における細胞周期解析:

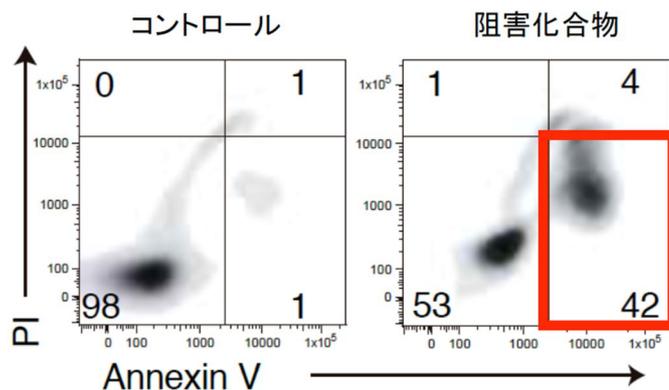
治療標的分子の機能阻害化合物で細胞周期のG1停止が顕著に観察される



(図2)

T/NK細胞リンパ腫細胞におけるアポトーシス解析:

治療標的分子の機能阻害化合物でAnnexin V(+)/PI(-)で示されるアポトーシス細胞増加が顕著に観察される



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Zhang, JP., Song, Z., Wang, HB., Lang, L., Yang YZ., Xiao, W., Webster, DE., Wei, W., Barta, SK., Kadin, ME., Staudt, LM., Nakagawa, M., and Yang, Y.	4. 巻 132
2. 論文標題 A novel model of controlling PD-L1 expression in ALK+ Anaplastic Large Cell Lymphoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 171-185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2019001043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ohigashi, H., Hashimoto, D., Hayase, E., Takahashi, S., Ara, T., Yamakawa, T., Sugita, J., Onozawa, M., Nakagawa, M., Teshima, T.	4. 巻 3
2. 論文標題 Ocular instillation of vitamin A-coupled liposomes containing HSP47 siRNA ameliorates dry eye syndrome in chronic GVHD.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Adv.	6. 最初と最後の頁 1003-1010
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2018028431	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakagawa M, Shaffer AL, Ceribelli M, Zhang M, Wright G, Huang DW, Xiao W, Powell J, Petrus MN, Yang Y, Phelan JD, Kohlhammer H, Dubois SP, Yoo HM, Bachy E, Webster DE, Yang Y, Xu W, Yu X, Zhao H, Bryant BR, Shimono J, Ishio T, Maeda M, Green PL, Waldmann TA, Staudt LM.	4. 巻 34
2. 論文標題 Targeting the HTLV-I-Regulated BATF3/IRF4 Transcriptional Network in Adult T Cell Leukemia/Lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Cell	6. 最初と最後の頁 286 ~ 297.e10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ccell.2018.06.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hidaka Daisuke, Hayase Eiko, Shiratori Souichi, Hasegawa Yuta, Ishio Takashi, Tateno Takahiro, Okada Kohei, Goto Hideki, Sugita Junichi, Onozawa Masahiro, Nakagawa Masao, Kahata Kaoru, Endo Tomoyuki, Hashimoto Daigo, Teshima Takanori	4. 巻 32
2. 論文標題 The association between the incidence of intestinal graft-vs-host disease and antibiotic use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Transplantation	6. 最初と最後の頁 e13361 ~ e13361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ctr.13361	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Phelan JD, Young RM, Webster DE, Roulland S, Wright GW, Kasbekar M, Shaffer AL, Ceribelli M, Wang JQ, Schmitz R, Nakagawa M, Bachy E, Huang DW, Ji Y, Chen L, Yang Y, Zhao H, Yu X, Xu W, Palisoc MM et al.	4. 巻 560
2. 論文標題 A multiprotein supercomplex controlling oncogenic signalling in lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 387 ~ 391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-018-0290-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hashiguchi Junichi, Onozawa Masahiro, Oguri Satoshi, Fujisawa Shinichi, Tsuji Masahisa, Okada Kohei, Nakagawa Masao, Hashimoto Daigo, Kahata Kaoru, Kondo Takeshi, Shimizu Chikara, Teshima Takanori	4. 巻 20
2. 論文標題 Development of a Fluorescence in Situ Hybridization Probe for Detecting IKZF1 Deletion Mutations in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Molecular Diagnostics	6. 最初と最後の頁 446 ~ 454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmoldx.2018.02.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishio Takashi, Sugita Junichi, Tateno Takahiro, Hidaka Daisuke, Hayase Eiko, Shiratori Souichi, Okada Kohei, Goto Hideki, Onozawa Masahiro, Nakagawa Masao, Hashimoto Daigo, Kahata Kaoru, Fujimoto Katsuya, Endo Tomoyuki, Kondo Takeshi, Teshima Takanori	4. 巻 24
2. 論文標題 Hematogones Predict Better Outcome in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Irrespective of Graft Sources	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biology of Blood and Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 1990 ~ 1996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbmt.2018.06.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyashita Naohiro, Onozawa Masahiro, Hayasaka Koji, Yamada Takahiro, Migita Ohsuke, Hata Kenichiro, Okada Kohei, Goto Hideki, Nakagawa Masao, Hashimoto Daigo, Kahata Kaoru, Kondo Takeshi, Kunishima Shinji, Teshima Takanori	4. 巻 97
2. 論文標題 A novel heterozygous ITGB3 p.T720del inducing spontaneous activation of integrin α IIb β 3 in autosomal dominant macrothrombocytopenia with aggregation dysfunction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 629 ~ 640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-017-3214-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 01.Wang, H., Wei, W., Zhang, JP., Song, Z., Li, Y., Xiao, W., Liu, Y., Zeng, MS., Petrus, MN., Thomas, CJ., Kadin, ME., Nakagawa, M., Waldmann, TA., Yang, Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 A novel model of alternative NF-kappaB pathway activation in anaplastic large cell lymphoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-020-01088-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Takashi Ishio, Joji Shimono, Sarvesh Kumar, Yuquan Lin, Emmanuel Bachy, Michael N. Petrus, Yandan Yang, Michiyuki Maeda, Hideki Goto, Hashino Satoshi, Takanori Teshima, Thomas A. Waldmann, Louis M. Staudt, and Masao Nakagawa
2. 発表標題 Genome-Wide CRISPR Library Screening Identifies CDK6 As Genetic Vulnerability in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma.
3. 学会等名 61st ASH Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masao Nakagawa, Joji Shimono, Takashi Ishio, Takanori Teshima
2. 発表標題 BATF3/IRF4 transcriptional complex suppresses cellular immunity-associated gene signature in HTLV1-associated ATLL cells
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下埜 城嗣、石尾崇、後藤秀樹、堤豊、盛暁生、小林一、黒澤光俊、柿木康孝、重松明男、太田秀一、酒井基、宮城島拓人、長谷山美仁、岩崎博、山本聡、國枝 保幸、橋野聡、三好寛明、大島孝一、畑中 豊、松野吉宏、中川雅夫、豊嶋崇徳
2. 発表標題 Clinicopathological analysis of BATF3 and IRF4 in PTCL
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Ishio, Sarvesh Kumar, Thomas A. Waldmann and Masao Nakagawa
2. 発表標題 The combination of the CDK4/6 inhibitor palbociclib with mTOR inhibitors showed addivity in the treatment of HTLV-1 associated adult T-cell leukemia
3. 学会等名 the 12th Annual T-cell Lymphoma Forum (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakagawa M, Endo T, Teshima T, Waldmann TA, Staudt LM
2. 発表標題 Molecular mechanisms of HBZ for ATLL cell proliferation
3. 学会等名 The 28th annual Meeting of the Japanese Association for Antiviral Therapy
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakagawa M.
2. 発表標題 Critical roles of BATF3/IRF4 in PTCL pathogenesis
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the Japanese Society for Lymphoreticular Tissue Research. (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakagawa M.
2. 発表標題 Recent advances of molecular pathogenesis of B-cell lymphomas
3. 学会等名 The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakagawa M.
2. 発表標題 PTCL におけるBATF3/IRF4
3. 学会等名 第4 回リンパ腫分子病態研究会 沖縄シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakagawa M.
2. 発表標題 "Targeting the HTLV-I-regulated BATF3/IRF4 Transcriptional Network in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma"
3. 学会等名 "The 34th Nagoya International Cancer Treatment Symposium" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学大学院 医学研究院 血液内科 リンパ系腫瘍研究グループ http://www.hokudai-hematology.jp/medical/basic-research/index3.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Fox Chase Cancer Center	National Institutes of Health	